



УКРАЇНА

(19) UA (11) 62017 (13) U
(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ШТАМ CAMPYLOBACTER JEJUNI SUBSPECIES JEJUNI C.2008 ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ІМУНОБІОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

1

2

(21) u201100255

(22) 10.01.2011

(24) 10.08.2011

(46) 10.08.2011, Бюл.№ 15, 2011 р.

(72) КАСЯНЕНКО ОКСАНА ІВАНІВНА, ФОТІНА
ТЕТЯНА ІВАНІВНА

(73) СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ

(57) Штам *Campylobacter jejuni* subspecies *jejuni* C.2008 для виготовлення імунобіологічних препаратів, який здатний до прискореного росту, високого накопичення бактеріальної маси та в РА не дає перехресних реакцій з гетерологічними культурами (сальмонелами, шигелами і стафілококами), що депоновано за № 478 у Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (м. Київ).

Корисна модель належить до ветеринарної мікробіології і біотехнології, а саме до виробничих штамів кампілобактерій *Campylobacter jejuni* subspecies *jejuni*, що використовуються в технологічному процесі виготовлення імунобіологічних препаратів.

Існує декілька виробничих штамів, які рекомендовані Європейською фармакопеею для виробництва імунобіологічних препаратів. Відомий виробничий штам *Campylobacter jejuni* № 11168 (АТСС) Американської колекції штамів мікроорганізмів [Ефимочкина Н.Р. Новые бактериальные патогены в пищевых продуктах: экспериментальное обоснование и разработка системы контроля с применением методов микробиологического и молекулярно-генетического анализа: автореф. дис. на соискание научн. степени докт. биол. наук: спец. 14.02.01 "Гигиена" / Н.Р. Ефимочкина. - М., 2010.-48 с.].

Відомі виробничі штами *Campylobacter jejuni* 1/NCTC11168 колекції штамів мікроорганізмів ГННИСК стандартизації і контролю медичних препаратів ім. Л.А. Тарасевича (м. Москва), *Campylobacter jejuni* 33291 - із колекції штамів мікроорганізмів НИИЭМ ім. Н.Ф. Гамалеї РАМН.

Суттєвим недоліком всіх перелічених вище штамів є те, що отримані кампілобактеріозні моноспецифічні та полігрупові аглютинуючі сироватки для ревматоїдного артриту (РА) дають в низьких титрах перехресні реакції з гетерологічними культурами (сальмонелами, шигелами, стафілококами). [Алиева Е.В. Разработка лабораторных экспресс-методов и технологии производства иммунодиагностических препаратов для выявле-

ния возбудителей листериоза и кампилобактериоза: автореф. дис. на здобуття наук, ступеня докт. мед. наук: спец. 03.00.07 "Мікробіологія", 03.00.23 "Біотехнологія" / Е.В. Алиева. - М., 2008.-33 с.].

Найбільш близьким за суттю та досягнутими результатами до запропонованого нами є виробничий штам *Campylobacter jejuni* subspecies *jejuni* 70.2Т колекції штамів мікроорганізмів інституту Пастера (Франція), ізолюваний L.Florent із фекалій корови. Однак, даний штам має низький вихід бактеріальної маси кампілобактерій в процесі їх культивування на щільному живильному середовищі для культивування кампілобактерій і, відповідно, низький вихід антигенного матеріалу.

Наведені обставини вимагали пошуку штаму саме циркулюючого штаму *Campylobacter jejuni*, здатного до швидкого росту та високого накопичення бактеріальної маси кампілобактерій при культивуванні їх на відповідному живильному середовищі.

В основу корисної моделі поставлена задача ізолювати циркулюючі штами *Campylobacter jejuni* subspecies *jejuni*, здатні до прискореного росту та високого накопичення бактеріальної маси кампілобактерій при культивуванні їх на живильному середовищі з метою подальшого використання ізолятів для виготовлення імунобіологічних препаратів.

Поставлену задачу вирішували шляхом дослідження продуктів забою птиці на предмет ізоляції циркулюючих штамів кампілобактерій виду *Campylobacter jejuni*, подальшої ідентифікації та вивчення біологічних властивостей ізолятів. Творчим колективом НАУ (Фотіна Т.І. та Касяненко

UA (11) 62017 (13) U

О.І.) виділені із м'яса птиці культури *Campylobacter jejuni* subspecies *jejuni*, які депоновано за номером № 478 у Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (м. Київ). (Оцінка ризиків мікробіологічної безпеки продуктів забою птиці та обладнання в умовах агропродовольчих ринків / О.І. Касяненко, Т.І. Фотіна // Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету, 2008. - № 92. - С. 231-234.

Ізоляти адаптували до середовища поживного щільного для культивування кампілобактерій (ТУ У 24.4-14332579-056:2010), яке використовуються в технологічному процесі одержання діагностичної сироватки кампілобактеріозної аглютинуючої, культивуючи його на означеному живильному середовищі впродовж 2-3 генерацій з застосуванням способу підвищеного накопичення бактеріальної маси кампілобактерій. Поставлена задача вирішується завдяки тому, що можливість використання вітчизняною біологічною промисловістю циркулюючих штамів *Campylobacter jejuni* для виробництва імунобіологічних препаратів дозволяє підвищити специфічну активність діагностичних кампілобактеріозних аглютинуючих сироваток, спростити та знизити вартість процесу їх одержання і разом з тим підвищити вихід цільового продукту.

Приклад 1. Морфологічні властивості штаму.

Грамнегативний. Збудник фарбується аніліновими фарбниками і досить чітко фуксином Пфейфера в розведенні 1:5 (1-2 хв.). Кампілобактерії представлені грамнегативними поліморфними тонкими паличками. В мазках *Campylobacter jejuni* мають вигляд коми, S-подібної форми, крил чайки при з'єднанні двох клітин в короткий ланцюг.

Приклад 2. Культуральні властивості.

Інкубацію посівів проводили при температурі +37,0 та +42,0 °C у мікроаерофільних і капнофільних умовах. Оптимальний склад газового середовища складає: 5 % кисню, 10 % вуглекислого газу, 85 % азоту. Для культивування кампілобактерій використовували середовище поживне щільне для культивування кампілобактерій (ТУ У 24.4-14332579-056:2010). На поживному середовищі ріст кампілобактерій виявляли у вигляді вологих, блискучих негемолітичних колоній, сироватоматового кольору. Також виявляли ізольовані колонії круглої форми, добре контуровані, помірно випуклі, матові в падаючому світлі та при розгляді збоку, негемолітичні, які поступово досягають 1-3 мм у діаметрі. В напіврідкому поживному середовищі (МПППА) бактерії росли у вигляді тонких тендітних дисків, які повільно піднімаються до поверхні середовища і ставали більш щільними. Через 24-72 години культури утворювали дифузний шар (1-3 мм) під поверхнею поживного середовища. Ріст досліджуваних культур кампілобактерій виявили в МПППА з 1 % гліцину, 1 % бичачої жовчі. Не виявили ознак росту культур на МПППА з 3,5 % хлористого натрію.

Приклад 3. Ідентифікація *Campylobacter jejuni*.

Визначення виду кампілобактерій проведено за результатами температурного тесту. В три пробірки з м'ясо-печінковим лептонним напіврідким агаром внесли по дві краплі зависі мікроорганізмів,

концентрація якої становила 1 млрд. мікробних тіл в 1 см³ за оптичним стандартом мутності. Посіви інкубували в мікроаерофільних умовах Пробірки при температурі 25 °C, 37 °C і 42 °C. За результати температурного тесту встановлено, що досліджувані культури кампілобактерій росли при температурі 37 °C і 42 °C. При температурі 25 °C ріст культур не виявлено. Рухливість культур визначали в препаратах "роздавлена крапля". Мікроорганізми досліджуваного штаму *C. jejuni* були рухливі. Рух характеризувався як інтенсивний, гвинтоподібний. За результатами вивчення гемолітичних властивостей ізолятів встановлено, що досліджуваний штам мікроорганізмів не утворював навколо колоній зон гемолізу. Визначення роду *Campylobacter* проводили за здатністю культур продукувати цитохромоксидазу і каталазу. Постановку тесту на цитохромоксидазу проводили шляхом нанесення добової агарової культури на фільтрувальний папір, додаючи суміш, яка складається з трьох частин: 1 %-го водного розчину диметилпарафенілендіаміну гідрохлориду та двох частин 1 %-го спиртового розчину альфа-нафтолу. Виявили зміну кольору колоній на темно-синій через 20 секунд, що свідчить про позитивну реакцію. Як позитивний контроль ставили реакцію з добовою агаровою культурою псевдо монади, а як негативний - з *E. coli*. Перевірку свіжовиділених культур на наявність каталазної активності здійснювали експрес-методом. Досліджувану культуру на предметному склі змішували з краплею 3 %-го розчину перекису водню. Облік реакції проводили через декілька секунд. Виявили появу пухирців, що свідчить про позитивну реакцію.

Диференціацію кампілобактерій підвиду *jejuni* здійснювали за результатами тесту гідролізу гіпурату натрію. Свіжоприготовлений 1 % розчин гіпурату нагрію розливали в преципітаційні пробірки по 0,4 см³. Дві петлі добової агарової культури суспензували в розчині гіпурату. Пробірки інкубували в термостаті при +37 °C протягом двох годин. Після інкубації по стінкам пробірок нашарували 0,2 см³ 3,5 % нингідринного реактиву в суміші рівних частин ацетону і бутанолу. Пробірки при цьому не струшували. Інкубацію продовжували ще 10 хвилин при тій же температурі. Облік реакції проводили на основі зміни кольору реактиву. Виявили появу темно-фіолетового кольору, що свідчить про гідроліз гіпурату з утворенням гліцину.

Досліджуваний штам мікроорганізмів чутливий до налідиксової кислоти, брильянтової зелені в розведенні 1:33000 та 1:100000. Штам резистентний до поліміксину, ванкомицину, триметоприму, амфотерицину та цефалотину.

Приклад 4. Патогенність.

Патогенність культур *Campylobacter jejuni* subspecies *jejuni* С.2008 вивчали на кролях, масою 3,5-4 кг. Досліджуваний штам мікроорганізмів патогенний для лабораторних тварин. При патологоанатомічному дослідженні виявляли: в одній або обох частках печінки виявляють просоподібні утворення сіро-білого кольору, некротичні вогнища сягають від 0,5 до 15 мм. Зміни в шлунково-кишковому тракті характеризуються геморагіями в тонкому і товстому відділах кишечника, ентерита-

ми різного ступеня та виразково-некротичними ураженнями ділянки біфуркації сліпих кишок. Виявлено запальні процеси в сечостатевій системі: ниркової миски, сечоводів, сечового міхура та сфі-

нктерів. Сечовий міхур збільшений в розмірах в 2-4 рази, заповнений каламутною сечею світло-жовтого кольору, слизова оболонка вкрита смугастими крововиливами.